维生素 C 对圆斑星鲽幼鱼抗氨氮胁迫能力的影响

王贞杰[1,2]　叶保民[3]　陈四清[1*]　常　青[1]　刘长琳[1]　胡建成[1]　严俊丽[1,2]　卢　斌[1,2]

（1.农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放试验室，中国水产科学研究院黄海水产研究所，青岛 266071；2.上海海洋大学水产与生命学院，上海 201306；3.辽宁省海洋与渔业厅，沈阳 110000）

摘　要：氨氮污染是水产养殖中重要的污染物，因此提高鱼体抗污染应激能力至关重要。本试验采用不同维生素 C 含量的饲料饲喂圆斑星鲽幼鱼，探究饲料维生素含量对圆斑星鲽幼鱼抗氨氮胁迫能力的影响。试验在(12.5±1.5) ℃的水温下进行，选择体重为（38.0±0.8） g 的健康圆斑星鲽幼鱼，随机分为 7 组（每组 3 个重复，每个重复 30 尾），分别投喂维生素 C 含量为 10.2(对照)、249.1、402.8、616.2、769.5、909.4 和 1 177.8 mg/kg 的试验饲料 8 周。投喂试验结束后，从每个重复取 10 尾鱼，用 20 mg/L 的氨氮胁迫 24 h。结果表明：无论是氨氮胁迫前还是氨氮胁迫后，在饲料维生素 C 含量达到 769.5 mg/kg 时，肝脏和肌肉中维生素 C 积累达到饱和，再继续升高饲料维生素 C 含量，肝脏、肌肉中维生素 C 含量不再显著升高($P>0.05$)。除 1 177.8 mg/kg 维生素 C 组外，无论是氨氮胁迫前还是氨氮胁迫后，各维生素 C 添加组圆斑星鲽幼鱼血清中过氧化氢酶（CAT）和超氧化物歧化酶（SOD）活性均显著高于对照组（$P<0.05$）。除 616.2 mg/kg 维生素 C 组血清中 CAT 活性无显著变化($P>0.05$）外，氨氮胁迫使各组血清中 CAT 和 SOD 活性显著降低（$P<0.05$），但添加维生素 C 可以减少降低的幅度。无论是氨氮胁迫前还是氨氮胁迫后，各维生素 C 添加组鳃丝 Na^+/K^+-ATP 酶活性均显著高于对照组（$P<0.05$）。氨氮胁迫使对照组及 909.4 和 1 177.8 mg/kg 维生素 C 组鳃丝 Na^+/K^+-ATP 酶活性显著降低（$P<0.05$），其他组则无显著变化($P>0.05$)。氨氮胁迫使各

收稿日期：2016-06-16
基金项目：中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费资助(20603022016005)
作者简介：王贞杰(1990−)，女，山东枣庄人，硕士研究生，从事水产养殖研究方向。E-mail: 1218370725@qq.com
*通信作者：陈四清，研究员，硕士生导师，E-mail: chensq@ysfri.ac.cn

组血清中葡萄糖和乳酸含量显著升高（$P<0.05$），对照组血清中皮质醇含量显著升高（$P<0.05$）。此外，氨氮胁迫使各组血清中总铁结合力显著降低（$P<0.05$）。综合各项测定指标，圆斑星鲽幼鱼饲料中维生素 C 含量在 402.8～616.2 mg/kg 时可有效提高机体抗氨氮胁迫能力。

关键词：圆斑星鲽幼鱼；维生素 C；应激反应；抗氨氮胁迫

中图分类号：S963　文献标识码：A　文章编号：

近几年随着水产品工厂集约化养殖，水产养殖动物的食物残渣和排泄物会产生大量氨氮，大量的氨氮是诱发养殖水产动物发生病害的重要因素。对于硬骨鱼类，机体氮代谢的主要产物就是氨氮[1]，大多数硬骨鱼类对氨氮毒性反应敏感[2]。养殖水体中高浓度的氨氮可对鱼体抗氧化系统产生损害，使抗氧化酶的活性下降，氧自由基含量增加[3-4]，进而使机体非特异性免疫系统遭到破坏[5]，造成鱼类体内代谢系统紊乱，对外源细菌病毒的易感性增加[6]，使病害流行和爆发的隐患增加。

维生素 C(vitamin C)，又称 *L*-抗坏血酸，是动物生长、生产及维持正常生理功能必不可少的一种微量元素，对调节血脂代谢，维持正常的心脏、中枢神经和造血功能和机体内众多激素的合成起重要作用。维生素 C 可促进鱼类生长，缓解环境等不良应激反应，提高自身免疫力[7]。由于多数鱼类缺乏合成维生素 C 所必需的 *L*-古洛糖酸内酯氧化酶，因此自身不能合成维生素 C，必须从食物中获取[8]。已有试验表明，氨氮胁迫下，青鱼鳃丝中 Na^+/K^+-ATP 酶活性下降，鳃和肝脏组织及抗氧化系统等产生严重损伤[9]。圆斑星鲽(*Verasper variegatus*）是重要的经济养殖鱼类，在工厂集约化养殖中会出现水质突变（氨氮浓度骤升）和病害问题。本试验通过在饲料中添加维生素 C，探讨饲料维生素 C 含量对圆斑星鲽幼鱼抗氨氮胁迫能力的影响，以期为维生素 C 调控圆斑星鲽抵御环境应激的能力提供科学的理论指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验用鱼

试验用圆斑星鲽幼鱼来自烟台天源水产有限公司同一批次健康幼鱼，平均体重（38.0±0.8） g。

1.1.2 试验饲料

本试验参考文献[10]中基础饲料配方配制粗蛋白质含量为50.2%、粗脂肪含量为8.6%的基础饲料，其组成及营养水平见表1。以维生素C多聚磷酸酯(维生素C有效含量35%，购自青岛金海力水产科技有限公司)作为维生素C添加源，在基础饲料中分别添加0（对照）、1 500、3 000、4 500、6 000、7 500和9 000 mg/kg的维生素C磷酸酯，共配制7种试验饲料，7种试验饲料中对应的维生素C含量的实测值分别为10.2、249.1、402.8、616.2、769.5、909.4和1 177.8 mg/kg。将饲料原料粉碎后过60目筛，混匀并用制粒机制成粒径为5 mm的颗粒饲料，65 ℃烘干后于-20 ℃保存备用。

表1 基础饲料组成及营养水平(风干基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of the basal diet （air-dry basis） %

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
鱼粉 Fish meal	32.00
豆粕 Soybean meal	37.00
小麦粉 Wheat meal	10.60
磷虾粉 Shrimp meal	8.00
啤酒酵母 Beer yeast	6.00
鱼油 Fish oil	1.70
豆油 Soybean oil	1.70
磷脂 Phospholipid	1.00
胆碱 Choline chloride	0.50
维生素预混料 Vitamin premix1）	0.50
矿物质预混料 Mineral premix2）	0.50
磷酸二氢钙 $Ca(H_2PO_4)_2$	0.50
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels	
粗蛋白质 CP	50.2

粗脂肪 EE		8.6
粗灰分 Ash		12.8

1)维生素预混料为每千克饲粮提供 The vitamin premix provided the following per kg of the diet：维生素 A 乙酸酯 VA acetate 9 000 IU，VD_3 2 500 IU，维生素 E 乙酸酯 VE acetate 100 mg，VB_1 25 mg，VB_2 40 mg，VB_6 20 mg，VB_{12} 50.1 mg，VK 11 mg，生物素 biotin 1.2 mg，肌醇 inositol 700 mg，叶酸 folic acid 20 mg，泛酸钙 calcium pantothenate 500 mg，烟酸 niacin 1 500 mg。

2)矿物质预混料为每千克饲粮提供 The mineral premix provided the following per kg of the diet：$FeSO_4{\cdot}H_2O$ 80 mg，$CuSO_4{\cdot}5H_2O$ 50 mg，$MnSO_4{\cdot}H_2O$ 45 mg，$ZnSO_4{\cdot}H_2O$ 50 mg，$MgSO_4$ 1 500 mg，KIO_3 (1%) 80 mg，Na_2SO_3 20 mg，$CoCl_2$ 50 mg，沸石粉 zeolite powder 3 165 mg。

1.2 试验方法

1.2.1 饲养方法

将试验鱼随机分为 7 个组，每组 3 个重复，每个重复 30 尾，以重复为单位在圆柱型水槽（直径为 53 cm、高 60 cm）内暂养 1 周，试验期为 8 周。每天饱食投喂试验饲料 1 次(14:00)，连续充气增氧，保证充足的氧气，并保持环境安静，每天（08:00 和 15:00）定时换水。试验期间水温(12.5±1.5) ℃，pH 7.8±0.2，溶解氧浓度 6.0 mg/L 以上，并用氨氮测定仪对水体氨氮浓度进行监测，总氨氮浓度不高于 0.1 mg/L。

1.2.2 氨氮胁迫

投喂试验结束后，分别对各桶中圆斑星鲽进行计数、称重后从每桶取 10 尾鱼，参照胡毅等[9]方法，用氯化铵母液调节水体总氨氮浓度为 20 mg/L，氨氮胁迫 24 h。胁迫期间连续充气，保证溶解氧浓度不低于 5.0 mg/L，pH 在 7.31，胁迫后养殖水中非离子氨浓度为 0.272 mg/L。非离子氨浓度计算公式[11]如下：

$C1=1.216\times f\times C2/100$；

$f=100/(10^{pKa-pH}+1)$；

$pKa=0.090\ 18+2\ 729.92/T$；

T=273.15+t。

式中:$C1$ 为非离子氨浓度(mg/L);f 为氨的水溶液中非离子氨的摩尔百分比(%);$C2$ 为氨氮浓度(mg/L);T 为绝对温度(K);t 为摄氏温度(℃)。

1.2.3 样品采集与指标测定

分别对氨氮胁迫前后的试验鱼进行取样。每桶分别随机抽取 5 尾鱼，从尾部静脉取血 2 mL 左右，用 1%的肝素钠抗凝，低温放置 4 h 后 4 000 r/min 离心 10 min，分离的血清于-20 ℃保存，用于测定血清生化指标。试验鱼采血后进行解剖，分离出鳃、肝脏和肌肉，用于鳃丝 Na^+/K^+-ATP 酶活性及肝脏和肌肉维生素 C 含量测定。Na^+/K^+-ATP 酶活性采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒进行测定，维生素 C 含量采用 2，4-二硝基苯肼法测定。

1.3 统计分析

试验结果以平均值±标准差表示，用 SPSS 17.0 软件 ANOVA 过程进行单因素方差分析，P<0.05 为差异显著，差异显著者采用 Duncan 氏法进行多重比较检验。用 t 检验检测氨氮胁迫前后的变化。

2 结　果

2.1 饲料维生素 C 含量对氨氮胁迫前后圆斑星鲽幼鱼组织中维生素 C 含量的影响

由表 2 可知，氨氮胁迫前，血清中维生素 C 含量随着饲料维生素 C 含量的增加呈上升趋势，组间差异显著（P<0.05）；肝脏、肌肉中维生素 C 含量随着饲料中维生素 C 含量的增加先呈显著上升（P<0.05），当饲料维生素 C 含量达到 769.5 mg/kg 时，肝脏和肌肉中维生素 C 积累达到饱和，再继续升高饲料维生素 C 含量，肝脏、肌肉中维生素 C 含量不再显著升高(P>0.05)。氨氮胁迫后，血清中维生素 C 含量以 769.5 和 1 177.8 mg/kg 维生素 C 组较高，显著高于其他各组（P<0.05）；肌肉和肝脏中维生素 C 含量均以 769.5 mg/kg 维生素 C 组最高，显著高于其他各组（P<0.05）。与氨氮胁迫前相比，氨氮胁迫后 616.2 mg/kg 维生素 C 组血清中维生素 C 含量显著降低（P<0.05），而 769.5 和 1 177.8 mg/kg 维生素 C 组则显著

升高（P<0.05）；氨氮胁迫后对照组以及 769.5、909.4、1 177.8mg/kg 维生素 C 组肌肉中维生素 C 含量均出现显著降低（P<0.05）；氨氮胁迫后对照组以及 616.2、909.4、1 177.8mg/kg 维生素 C 组肝脏中维生素 C 含量均出现显著降低（P<0.05）。

表 2　饲料维生素 C 含量对氨氮胁迫前后圆斑星鲽幼鱼组织中维生素 C 含量的影响

Table 2　Effects of dietary vitamin C content on vitamin C content in tissues of juvenile spotted halibut before and after ammonia-nitrite stress　μg/kg

饲料维生素 C 含量 Dietary vitamin C content/(mg/kg)	血清 Serum		肌肉 Muscle		肝脏 liver	
	胁迫前 Before stressed	胁迫后 After stressed	胁迫前 Before stressed	胁迫后 After stressed	胁迫前 Before stressed	胁迫后 After stressed
10.2	4.65±0.32^{a}	4.53±0.78^{a}	8.53±0.06^{a}	7.67±1.62^{a*}	25.11±1.00^{a}	16.89±0.64^{a*}
249.1	18.55±0.64^{b}	18.23±0.98^{b}	29.5±1.05^{b}	29.21±1.45^{b}	71.49±2.62^{b}	70.66±1.04^{b}
402.8	26.86±1.58^{c}	25.32±1.55^{c}	50.15±2.23^{c}	50.08±2.11^{b}	85.72±0.64^{c}	81.46±2.32^{c}
616.2	35.59±1.87^{d}	33.22±1.74^{d*}	57.12±2.23^{d}	54.12±2.24^{b}	100.28±1.94^{d}	80.62±2.22^{c*}
769.5	40.25±0.72^{e}	45.32±2.01^{f*}	71.75±2.32^{e}	71.45±1.87^{c*}	113.59±2.41^{e}	108.67±2.56^{d}
909.4	43.33±1.87^{f}	42.23±2.43^{e}	71.05±0.94^{e}	67.05±1.34^{b*}	114.43±2.83^{e}	93.43±1.93^{d*}
1 177.8	47.47±1.10^{g}	48.75±2.94^{f*}	72.74±2.89^{e}	70.74±2.57^{b*}	109.71±1.93^{e}	92.76±1.69^{d*}

同行数据肩标不同大写字母表示差异极显著（P<0.05），不同小写字母表示差异显著，相同或无字母表示差异不显著（P>0.05）。氨氮应激后数据肩标*表示与氨氮应激前相比差异显著(P＜0.05)。下表同。

Values in the same row with different capital letter superscripts mean significant difference (P<0.01), and with different small letter superscripts mean significant difference (P<0.05), while with no or the same letter superscripts mean no significant difference (P>0.05). Values of after ammonia-nitrite stress with * superscript mean significant difference compared with before ammonia-nitrite stress. The same as below.

2.2 饲料维生素 C 含量对氨氮胁迫前后圆斑星鲽幼鱼血清抗氧化酶活性的影响

由表 3 可知，除 1 177.8 mg/kg 维生素 C 组外，无论是氨氮胁迫前还是氨氮胁迫后，各维生素 C 添加组圆斑星鲽幼鱼血清中 CAT 和 SOD 活性均显著高于对照组（P<0.05）。氨氮胁迫使血清中 CAT 和 SOD 活性降低，但添加维生素 C 可以使降低的幅度减少，除 616.2 mg/kg 维生素 C 组血清中 CAT 活性在氨氮胁迫前后无显著差异（P>0.05）外，其他组血清中 CAT

和 SOD 活性在氨氮胁迫前后均差异显著（*P*<0.05）。

表 3 饲料维生素 C 含量对氨氮胁迫前后圆斑星鲽幼鱼血清抗氧化酶活性的影响

Table 3 Effects of dietary vitamin C content on serum antioxidant enzyme activities of juvenile spotted halibut before and after ammonia-nitrite stress U/mL

饲料维生素 C 含量 Dietary vitamin C content/(mg/kg)	过氧化氢酶 CAT		超氧化物歧化酶 SOD	
	胁迫前 Before stressed	胁迫后 After stressed	胁迫前 Before stressed	胁迫后 After stressed
10.2	4.96±0.27[a]	3.48±0.41[a*]	70.18±2.66[a]	54.68±2.62[a*]
249.1	7.44±0.30[c]	7.09±1.76[bc*]	94.50±2.21[b]	71.21±3.57[b*]
402.8	9.05±0.13[f]	8.17±0.31[c*]	127.46±3.42[d]	111.17±6.31[d*]
616.2	8.10±0.27[de]	7.84±0.14[c]	131.15±4.56[d]	112.24±6.19[d*]
769.5	8.25±0.24[e]	7.31±2.03[bc*]	125.17±4.82[d]	115.40±2.17[d*]
909.4	6.52±0.13[b]	5.55±0.89[b*]	106.18±2.46[c]	95.17±2.92[c*]
1 177.8	6.71±0.23[b]	4.83±0.60[ab*]	104.20±3.42[c]	91.49±2.69[c*]

2.3 饲料维生素 C 含量对氨氮胁迫前后圆斑星鲽幼鱼鳃丝 Na^+/K^+-ATP 酶活性的影响

由表 4 可知，无论是氨氮胁迫前还是氨氮胁迫后，各维生素 C 添加组圆斑星鲽幼鱼鳃丝 Na^+/K^+-ATP 酶活性均显著高于对照组（*P*<0.05），各维生素 C 添加组间无显著差异（*P*>0.05）。氨氮胁迫使圆斑星鲽幼鱼鳃丝 Na^+/K^+-ATP 酶活性降低，但只有对照组及 909.4 和 1 177.8 mg/kg 维生素 C 组在氨氮胁迫前后有显著差异（*P*<0.05）。

表 4 饲料维生素 C 含量对氨氮胁迫前后圆斑星鲽幼鱼鳃丝 Na^+/K^+-ATP 酶活性的影响

Table 4 Effects of dietary vitamin C content on gill Na^+/K^+-ATPase activity of juvenile spotted halibut before and after ammonia-nitrite stress U/mg prot

饲料维生素 C 含量 Dietary vitamin C content/(mg/kg)	Na^+/K^+-ATP 酶 Na^+/K^+-ATPase	
	胁迫前 Before stressed	胁迫后 After stressed
10.2	13.44±0.36[a]	10.43±1.13[a*]
249.1	15.67±0.56[b]	14.86±0.31[b*]
402.8	16.67±0.66[b]	14.81±1.02[b*]
616.2	17.18±0.61[b]	15.12±0.11[b*]
769.5	17.20±1.33[b]	14.58±0.67[b*]
909.4	16.77±1.64[b]	14.56±0.61[b*]
1 177.8	16.33±1.36[b]	14.94±1.22[b*]

2.4　饲料维生素 C 含量对氨氮胁迫前后圆斑星鲽幼鱼血清部分应激指标的影响

由表 5 可知，氨氮胁迫前，饲料中添加维生素 C 对圆斑星鲽血清中皮质醇和乳酸含量未产生显著影响（P>0.05），但显著升高了血清中葡萄糖含量和总铁结合力（P<0.05）。氨氮胁迫后，饲料中添加维生素 C 显著升高了血清中总铁结合力（P<0.05），显著降低了血清中葡萄糖、皮质醇和乳酸含量（P<0.05）。氨氮胁迫使血清中葡萄糖、皮质醇和乳酸含量均有所升高，其中各组血清中葡萄糖和乳酸含量在氨氮胁迫前后均有显著差异（P<0.05），血清中皮质醇含量仅对照组在氨氮胁迫前后有显著差异（P<0.05）。此外，氨氮胁迫使血清中总铁结合力降低，各组在氨氮胁迫前后均有显著差异（P<0.05）。

表 5　维生素 C 对氨氮胁迫前后血清部分应激生化指标的影响

Table 5　Effects of dietary vitamin C content on serum part stress indices of juvenile spotted halibut before and after ammonia-nitrite stress

饲料维生素 C 含量 Dietary vitamin C content/(mg/kg)	葡萄糖 Glucose/（mmol/mL）		乳酸 Lactic acid/（mmol/L）	
	胁迫前 Before stressed	胁迫后 After stressed	胁迫前 Before stressed	胁迫后 After stressed
10.2	2.86±0.31^{a}	5.07±0.09^{a*}	2.99±0.16	5.16±0.40^{a*}
249.1	3.57±0.08^{b}	4.10±0.20^{b*}	2.87±0.11	3.99±0.28^{b*}
402.8	3.59±0.25^{b}	4.10±0.02^{b*}	2.90±0.14	3.26±0.11^{c*}
616.2	3.66±0.18^{b}	4.07±0.12^{b*}	2.91±0.18	4.18±0.22^{d*}
769.5	3.45±0.09^{b}	4.10±0.02^{b*}	2.92±0.03	4.09±0.11^{d*}
909.4	3.35±0.04^{b}	4.08±0.08^{b*}	3.08±0.18	4.37±0.08^{d*}
1 177.8	3.32±0.20^{b}	4.39±0.43^{c*}	3.01±0.17	4.49±0.11^{d*}

饲料维生素 C 含量 Dietary vitamin C content/(mg/kg)	皮质醇 Cortisol/(mmol/L)		总铁结合力 TIBC/(μmol/L)	
	胁迫前 Before stressed	胁迫后 After stressed	胁迫前 Before stressed	胁迫后 After stressed
10.2	314.40±8.37	399.61±11.26^{a*}	70.43±2.32^{a}	65.02±0.93^{a*}
249.1	285.28±32.26	331.40±30.53^{b}	84.68±1.68^{b}	75.46±1.13^{cd*}
402.8	291.81±11.26	327.54±42.78^{b}	83.66±3.20^{b}	77.93±3.96^{d*}
616.2	298.26±22.75	295.95±25.74^{b}	84.42±2.26^{b}	78.04±3.89^{d*}
769.5	282.45±29.26	303.36±18.00^{b}	80.18±3.28^{c}	76.67±0.37^{d*}
909.4	277.39±43.94	297.78±31.89^{b}	81.78±4.49^{c}	71.81±0.81^{bc*}
1 177.8	306.16±16.46	320.58±7.89^{b}	79.99±2.49^{c}	70.11±0.98^{cd*}

3 讨 论

饲料中添加维生素 C 可促进鱼类生长和生理代谢，但摄入过量维生素 C 对机体代谢反而产生抑制作用[12-13]。有研究表明，组织中维生素 C 含量与饲料维生素 C 含量呈正相关，但当饲料维生素 C 含量增加的一定水平后，组织中维生素 C 的积累量会达到饱和状态进入平台期[14]。本试验中，随着饲料维生素 C 含量的增加，肌肉、肝脏和血清中维生素 C 积累量均呈上升趋势，当维生素 C 含量达到 769.5 mg/kg 后，肝脏和肌肉中维生素 C 积累量达到饱和。组织中维生素 C 的积累储存主要是在肝脏中，其维生素 C 含量比肌肉中高很多，维生素 C 的代谢主要也是在肝脏中。氨氮胁迫对 249.1、402.8、616.2 mg/kg 维生素 C 组肌肉中维生素 C 含量无显著影响，对 249.1、402.8、769.5 mg/kg 维生素 C 组肝脏中维生素 C 含量无显著影响。维生素 C 具有抗氧化和增强机体免疫力的作用，是机体重要的生理调节因子，氨氮胁迫后，鱼体有可能通过释放肝脏中积累的维生素 C 来消除因胁迫应激机体产生的氧化自由基，进而缓解胁迫造成的氧化损伤，但对照组饲料维生素 C 含量低，不足以来缓解应激胁迫产生的氧化自由基。而胁迫后血清中维生素 C 含量降低不大甚至升高，可能与机体调节肝脏中的维生素 C 使组织中维生素 C 释放到血液中有关。本试验结果与周岐存等[14]对点带石斑鱼（*Epinepheluscoioides*）、Dabrowski 等[15]对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和 Wang 等[16]对鹦鹉鱼(*Oplegnathusfasciatus*)的研究结果一致。

动物机体提高抗氧化能力，清除体内过多自由基的防御系统有酶系统和非酶系统。其中酶系统主要包括 SOD 和 CAT 等酶。SOD 和 CAT 可以有效清除体内自由基，从而使自由基处于形成与消除的平衡状态，避免机体产生过氧化损伤[17]。当机体受到环境胁迫时，机体会产生大量自由基形成氧化胁迫，体内抗氧化酶活性和抗氧化物质含量下降，使机体抗氧化系统防御功能降低[9]。本试验结果显示饲料中添加维生素 C 可有效提高血清中 SOD 和 CAT 的活性，从而使机体抗氧化能力升高。氨氮胁迫后，各维生素 C 添加组中抗氧化酶活性降低幅度明显降低，说明维生素 C 可以缓解氨氮胁迫对圆斑星鲽抗氧化系统造成的损害。已有研究证明水产动物对抗酸[18]、盐[19]和氨氮[20]等胁迫环境的能力与体内维生素 C 的抗氧化

能力有关，与本试验结果与此相符。

鱼类呼吸及渗透调节主要由鳃部完成，Na^+/K^+-ATP 酶是鳃部泌氯细胞和细胞器膜上的一种蛋白酶[21]，在鱼体中主要参与渗透调节过程。有研究表明环境胁迫可使鳃丝 Na^+/K^+-ATP 酶活性降低[12]。本试验结果表明，饲料中添加维生素 C 后鳃丝中 Na^+/K^+-ATP 酶活性明显升高，氨氮胁迫后各组鳃丝中 Na^+/K^+-ATP 酶活性均出现不同程度的降低，但维生素 C 添加组的降低幅度较小。这说明饲料中添加维生素 C 可以缓解氨氮胁迫对鳃丝造成的负面影响，降低氨氮胁迫对圆斑星鲽鳃部渗透调节功能造成的损害。本试验结果与胡毅等[22]的研究结果一致，但 Wang 等[23]日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)的研究表明，氨氮胁迫下下饲料中维生素 C 含量达到 137.8 mg/kg 时鳃丝 Na^+/K^+-ATP 酶活性受到抑制的结果不一致，可能与物种对维生素 C 需求量不同有关。

皮质醇是当鱼体受到外界环境刺激时，下丘脑-垂体-肾间组织(hypothalamus-pituitary-interrenal，HPI)轴分泌的一种应激激素[24]，血液皮质醇含量是反映鱼类应激的灵敏信号[25]。研究发现，随着血液皮质醇含量的升高，血液葡萄糖含量也会升高[26]，原因可能是皮质醇能激活糖异生过程中的关键酶如葡萄糖-6-磷酸酶等，从而加速糖异生和糖原分解过程[25]，以满足鱼体在应激过程中对能量的需求。本试验中，氨氮胁迫后对照组血清中皮质醇含量显著升高，616.2 mg/kg 维生素 C 组氨氮胁迫前后无显著变化，说明饲料维生素 C 含量为 616.2 mg/kg 时可以提高圆斑星鲽幼鱼抵抗外界刺激的应激能力。有关研究表明，维生素 C 在调节皮质醇合成和应激反应中起重要作用。维生素 C 一方面通过阻碍不饱和脂肪酸的氧化进而减少类固醇的产生，阻止皮质醇的合成[27]，另一方面可利用神经调节因子，调节多巴胺和去甲肾上腺素在脑部的合成，从而控制其行为，使鱼类对应激反应的抵抗力增强[28]。葡萄糖是生物机体生理代谢的主要能量来源，因而血清中葡萄糖含量恒定对鱼类的正常生理活动有重要意义。氨氮胁迫后，各组血清中葡萄糖含量显著升高，尤其是对照组和 1 177.8 mg/kg 维生素 C 组，升高幅度较大。这与对许氏平鲉和花鲈[29]的研究结果

相似，原因是鱼类遇到外界环境胁迫时，糖类被作为能源物质迅速用于供能，以葡萄糖的形式进入血液使血液中葡萄糖含量升高。

乳酸是无氧呼吸能量代谢的产物，可以反映呼吸代谢的方式。鱼类受到氨氮胁迫时，鳃组织受到一定程度的破坏影响气体交换，进而使鱼体缺氧，机体有氧代谢受阻启动无氧代谢，因此血液中乳酸含量升高。本试验中，氨氮胁迫后各组血清中乳酸含量均显著升高，此结果与对锦鲤[30]、长缟鲹[31]的研究结果相一致。血清中乳酸含量以对照组升高幅度最大，402.8 mg/kg 维生素 C 组升高幅度最小，说明 402.8 mg/kg 维生素 C 能有效减轻氨氮胁迫对圆斑星鲽幼鱼有氧代谢的阻碍。结合血清中皮质醇、葡萄糖和乳酸含量的变化，得出饲料维生素 C 含量为 402.8～616.2 mg/kg 时可有效减轻氨氮胁迫对圆斑星鲽幼鱼的应激损伤。

铁是微生物繁殖代谢所必需的营养素。转铁蛋白的铁结合力很高，具有抑制微生物的生长繁殖的杀菌作用。本试验结果表明，各维生素 C 添加组血清中总铁结合力均显著高于对照组，且在维生素 C 含量为 249.1～616.2 mg/kg 时血清中总铁结合力较高，说明饲料中试验含量的维生素 C 可增强圆斑星鲽幼鱼的铁结合能力，进而提高其杀菌能力。氨氮胁迫后血清总铁结合力出现下降趋势，各维生素 C 添加组与对照组相比下降幅度较小，说明维生素 C 使圆斑星鲽幼鱼对抗环境刺激、抵抗病菌感染的能力增强。目前维生素 C 对水产动物血清总铁结合力的研究还没有报道，但是关于泛酸[32]和维生素 B_6[33]对幼健鲤血清总铁结合力的研究结果与本试验结果一致。

4 结 论

结合各项测定指标，圆斑星鲽幼鱼饲料中维生素 C 含量在 402.8～616.2 mg/kg 时可有效提高机体抗氨氮胁迫能力。

参考文献：

[1] FOSTER R P,GOLDSTEIN L.Formation of excretory products[M]//HOAR W S,RANDALL D J.Fish physiology,Vol.1.New York:Academic Press,1969:313–350.

[2] HANDY R D,POXTON M G.Nitrogen pollution in mariculture:toxicity and excretion of nitrogenous compounds by marine fish[J].Reviews in Fish Biology and Fisheries,1993,3(3):205–241.

[3] ROMANO N,ZENG C S.Ontogenetic changes in tolerance to acute ammonia exposure and associated gill histological alterations during early juvenile development of the blue swimmer crab,*Portunus pelagicus*[J].Aquaculture,2007,266(1/2/3/4):246–254.

[4] CHING B,CHEW S F,WONG W P,et al.Environmental ammonia exposure induces oxidative stress in gills and brain of *Boleophthalmus boddarti* (*mudskipper*)[J].Aquatic Toxicology,2009,95(3):203–212.

[5] 李文祥,谢骏,宋锐,等.水体 PH 胁迫对异育银鲫皮质醇激素和非特异性免疫的影响[J].水生生物学报,2011,35(2):256–261.

[6] 洪美玲.水中亚硝酸盐和氨氮对中华绒螯蟹幼体的毒性效应及维生素 E 的营养调节[D].博士学位论文.上海:华东师范大学,2007.

[7] 宋学宏,蔡春芳,潘新法,等.用生长和非特异性免疫力评定异育银鲫维生素 C 需要量[J].水产学报,2002,26(4):351–356.

[8] 沈同.生物化学[M].北京:高等教育出版社,1991:365–367.

[9] 胡毅,黄云,钟蕾,等.氨氮胁迫对青鱼幼鱼鳃丝 Na^{+}/K^{+}-ATP 酶、组织结构及血清部分生理生化指标的影响[J].水产学报,2012,36(4):538–545.

[10] 吕云云,陈四清,于朝磊,等.饲粮蛋白脂肪比对圆斑星鲽(*Verasper variegates*)生长、消化酶及血清生化指标的影响[J].渔业科学进展.2015,36(2):118-124.

[11] 滕恩江,刘廷良,安华.地面水环境质量标准非离子氨换算方法[J].中国环境监测,1995,11(4):9–21.

[12] 陈建明,叶金云,潘茜,等.饲料中添加维生素 C 对翘嘴鲌鱼种生长及组织中抗坏血酸含

量的影响[J].中国水产科学,2007,14(1):106–112.

[13] AI Q H,MAI K S,ZHANG C X,et al.Effects of dietary vitamin C on growth and immune response of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*[J].Aquaculture,2004,242(1/2/3/4):489–500.

[14] 周岐存,刘永坚,麦康森,等.维生素 C 对点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)生长及组织中维生素 C 积累量的影响[J].海洋与湖沼,2005,36(2):152–158.

[15] DABROWSKI K,LEE K J,GUZ L.Effects of dietary ascorbic acid on oxygen stress (hypoxia or hyperoxia),growth and tissue vitamin concentrations in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J].Aquaculture,2004,233(1/2/3/4):383–392.

[16] WANG X J,KIM K W,BAI S C,et al.Effects of the different levels of dietary vitamin C on growth and tissue ascorbic acid changes in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*)[J].Aquaculture,2003,215(1/2/3/4):203–211.

[17] 陈昌生,王淑红,纪德华,等.氨氮对九孔鲍过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活力的影响[J].上海水产大学学报,2001,10(3):218–222.

[18] ZHOU X Q,XIE M X,NIU C J,et al.The effects of dietary vitamin C on growth,liver vitamin C and serum cortisol in stressed and unstressed juvenile soft-shelled turtles (*Pelodiscus sinensis*)[J].Comparative Biochemistry and Physiology Part A,2003,135(2):263–270.

[19] LIM L C,DHERT P,CHEW W Y,et al.Enhancement of stress resistance of the guppy *Poecilia reticulata* through feeding with vitamin C supplement[J].Journal of the World Aquaculture Society,2002,33(1):32–40.

[20] WAN G W N,WANG Y,WANG A L.Effect of supplemental *L*-ascorbyl-2-polyphosphate (APP) in enriched live food on the immune response of *Penaeus vannamei* exposed to

ammonia-N[J].Aquaculture,2006,256(1/2/3/4):552–557.

[21] 徐力文,刘广锋,王瑞旋,等.急性盐度胁迫对军曹鱼稚鱼渗透压调节的影响[J].应用生态学报,2007,18(7):1596–1600.

[22] 胡毅,黄云,文华,等.维生素 C 对青鱼幼鱼生长、免疫及抗氨氮胁迫能力的影响[J].水产学报,2013,37(4):565–573.

[23] WANG A L,WANG W N,WANG Y,et al.Effect of dietary vitamin C supplementation on the oxygen consumption,ammonia-N excretion and Na^+/K^+ ATPase of *Macrobrachium nipponense* exposed to ambient ammonia[J].Aquaculture,2003,220(1/2/3/4):833–841.

[24] BERNIER N J,PETER R E.The hypothalamic-pituitary-interrenal axis and the control of food intake in teleost fish[J].Comparative Biochemistry and Physiology Part B,2001,129(2/3):639–644.

[25] MOMMSEN T P,VIJAYAN M M,MOON T W.Cortisol in teleosts:dynamics,mechanisms of action,and metabolic regulation[J].Fisher Reviews in Fish Biology and Fisheries,1999,9(3):211–268.

[26] PÉREZ-CASANOVA J C,RISE M L,DIXON B,et al.The immune and stress responses of Atlantic cod to long-term increases in water temperature[J].Fish & Shellfish Immunology,2008,24(5):600–609.

[27] KITABCHI A E.Ascorbic acid in steroidogenesis[J].Nature,1967,215(5108):1385–1386.

[28] JOHNSTON W L,MAC DONALD E HILTON J W.Relationships between dietary ascorbic acid status and deficiency,weight gain and brain neurotransmitter levels in juvenile rainbow trout,*Salmo gairdneri*[J].Fish Physiology and Biochemistry,1989,6(6):353–365.

[29] 洪磊,张秀梅.环境胁迫对许氏平鲉和花鲈血糖、血沉降的影响[J].中国水产科学,2005,12(4):414–418.

[30] LUSHCHAK V I,BAGNYUKOVA T V,LUSHCHAK O V,et al.Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues[J].The International Journal of Biochemistry & Cell Biology,2005,37(6):1319–1330.

[31] WELLS R M G,BALDWIN J.Plasma lactate and glucose flushes following burst swimming in silver trevally (*Pseudocaranx dentex*:Carangidae) support the “releaser” hypothesis[J].Comparative Biochemistry and Physiology Part A,2006,143(3):347–352.

[32] 文泽平.泛酸对幼建鲤消化吸收功能和免疫功能的影响[D].硕士学位论文.雅安:四川农业大学,2008:1–80.

[33] 何伟.吡哆醇对幼建鲤消化吸收能力和免疫能力的影响[D].硕士学位论文.雅安:四川农业大学,2008:1–77.

Effect of Dietary Vitamin C Content on Anti-Ammonia-Nitrite Stress Ability of Juvenile Spotted Halibut (*Verasper variegatus*)

WANG Zhenjie[1,2] YE Baomin[3] CHEN Siqing[1*] CHANG Qing[1] LIU Changlin[1] HU Jiancheng[1] YAN Junli[1,2] LU Bin[1,2]

（1. *Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resource, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao* 266071, *China*; 2. *College of Fishers and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai* 201306, *China;* 3. *Administration of Ocean and Fisheries of Liaoning Province, Shenyang* 110000, *China*）

Abstract: Ammonia-nitrogen pollution is one of the important pollutants in aquaculture, thus improving the resistance of pollution stress of the fish is very important. This experiment using different vitamin C contents diets to feed juvenile spotted halibut (*Verasper variegatus*), in order to get the effect of dietary vitamin C content on anti-ammonia-nitrogen stress ability of juvenile

*Corresponding author, professor, E-mail: chensq@ysfri.ac.cn (责任编辑　菅景颖)

spotted halibut. Water temperature was maintained at (12.5±1.5) ℃ in this experiment. Juvenile spotted halibut with the body weight of（38.0±0.8） g were randomly assigned into 7 groups with 3 replicates per group and 30 fish per replicate, and fed 7 experimental diets with the vitamin C content were 10.2, 249.1, 402.8, 616.2, 769.5, 909.4 and 1 177.8 mg/kg, respectively. The experiment lasted for 8 weeks. After feeding trial, each replicate selected 10 fish to stress 24 h by 20 mg/L ammonia-nitrogen. The results showed as follows: whether before or after ammonia-nitrite stress, the vitamin C accumulation in muscle and liver reached saturation when dietary vitamin C content was 769.5 mg/kg, and continued to rise the dietary vitamin C content, the vitamin C content in muscle and liver was not significantly increased (P>0.05）. The activities of serum catalase（CAT）and superoxide dismutase（SOD）in vitamin C addition groups except 1 177.8 mg/kg vitamin C group were significantly higher than those in control group whether before or after ammonia-nitrite stress （P<0.05）. The activities of serum CAT and SOD in groups except serum CAT activity in 616.2 mg/kg vitamin C group were significantly decreased by ammonia-nitrite stress （P<0.05）, and decline ranges in vitamin C addition groups were less compared with control group. The gill Na^+/K^+-ATPase activity in vitamin C addition groups was significantly higher than that in control group whether before or after ammonia-nitrite stress （P<0.05）. The gill Na^+/K^+-ATPase activity in control group and 909.4, 1 177.8 mg/kg vitamin C groups was significantly decreased （P<0.05）, but that in other groups had no significant change after ammonia-nitrite stress (P>0.05）. Ammonia-nitrite stress significantly increased the contents of serum glucose and lactic acid in all groups （P<0.05）, and significantly increased the serum cortisol content in control group （P<0.05）, while significantly decreased the serum total iron binding capacity (TIBC) in all groups （P<0.05）. Base on a comprehensive consideration of various measured indices, when dietary vitamin C content is 402.8 to 616.2 mg/kg, the

anti-ammonia-nitrogen stress ability of juvenile spotted halibut can be effectively improved.

Key words: juvenile spotted halibut (*Verasper variegatus*); vitamin C; stress response; anti-ammonia-nitrite stress